

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006113

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-105219  
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2004年 3月31日

出願番号  
Application Number: 特願2004-105219

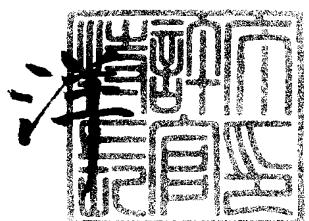
パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号  
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

出願人  
Applicant(s): 杉山 治夫

2005年 4月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 194247  
【提出日】 平成16年 3月31日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/12  
C12N 5/10

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西 2-19-30  
【氏名】 杉山 治夫

【特許出願人】

【識別番号】 595090392  
【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西 2-19-30  
【氏名又は名称】 杉山 治夫

【代理人】

【識別番号】 100068526  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 田村 恭生  
【電話番号】 06-6949-1261  
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【選任した代理人】

【識別番号】 100103230  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 高山 裕貢  
【電話番号】 06-6949-1261  
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【選任した代理人】

【識別番号】 100087114  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 斎藤 みの里  
【電話番号】 06-6949-1261  
【ファクシミリ番号】 06-6949-0361

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 223643  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0203207

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列に由来するHLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチド。

【請求項 2】

Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg (配列番号：2)に記載のアミノ酸配列を含有する、請求項1記載のペプチド。

【請求項 3】

エピトープペプチドである請求項1または2記載のペプチド。

【請求項 4】

請求項1～3いずれか記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

【請求項 6】

請求項5記載の発現ベクターを含有する細胞。

【請求項 7】

請求項6記載の細胞を、ペプチドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、請求項1～3いずれか記載のペプチドの製造方法。

【請求項 8】

請求項1または2記載のペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 9】

配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列に由来するHLA-A26結合性癌抗原ペプチド、好ましくは請求項2記載のペプチドとHLA-A26抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞。

【請求項 10】

配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列に由来するHLA-A26結合性癌抗原ペプチド、好ましくは請求項2記載のペプチドとHLA-A26抗原との複合体を認識するCTL。

【請求項 11】

請求項1～3いずれか記載のペプチド、請求項5記載の発現ベクター、請求項6記載の細胞、請求項9記載の抗原提示細胞、または請求項10記載のCTLと、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物。

【請求項 12】

CTLの誘導剤として使用される、請求項11記載の医薬組成物。

【請求項 13】

癌ワクチンとして使用される、請求項11記載の医薬組成物。

【請求項 14】

配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列に由来するHLA-A26結合性癌抗原ペプチド、好ましくは請求項2記載のペプチドとHLA-A26抗原とを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマー。

【請求項 15】

請求項14記載のHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペンタマーを成分として含有する、WT1由来のHLA-A26結合性癌抗原ペプチド特異的なCTLの検出用試薬。

【請求項 16】

以下のa)～f)：

- a) Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val (配列番号：3)に記載のアミノ酸配列を含有するペプチド、
- b) 上記a)のペプチドを含有するエピトープペプチド、
- c) 上記a)またはb)のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクタ

一、

- d) 上記 c) の発現ベクターを含有する細胞、
- e) 上記 a) のペプチドと HLA-A\*0201 抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、および
- f) 上記 a) のペプチドと HLA-A\*0201 抗原との複合体を認識する CTL、のなかから選ばれるいずれかと薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物。

【請求項 17】

CTLの誘導剤として使用される、請求項 16 記載の医薬組成物。

【請求項 18】

癌ワクチンとして使用される、請求項 16 記載の医薬組成物。

【請求項 19】

Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val (配列番号: 3) に記載のアミノ酸配列を含有するペプチドと HLA-A\*0201 抗原とを含有する HLA モノマー、HLA ダイマー、HLA テトラマーまたは HLA ペンタマー。

【請求項 20】

請求項 19 記載の HLA モノマー、HLA ダイマー、HLA テトラマーまたは HLA ペンタマーを成分として含有する、WT1 由来の HLA-A\*0201 結合性癌抗原ペプチド特異的な CTL の検出用試薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】WT1由来の癌抗原ペプチド

【技術分野】

【0001】

本発明は、WT1由来の癌抗原ペプチドおよびその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

WT1遺伝子 (Wilms' tumor gene 1) は、小児の腎腫瘍であるWilms腫瘍の原因遺伝子の1つとして同定された (非特許文献1および2を参照)。WT1遺伝子は転写因子WT1をコードしており、WT1は細胞の増殖・分化・アポトーシス及び臓器の形成などに関する重要な働きをする (非特許文献3を参照)。当初、WT1遺伝子は、癌抑制遺伝子と位置付けられていたが、その後の研究により白血病及び肺癌や乳癌を含む種々の固体癌で発現が認められ、むしろ癌の増殖を促進する癌遺伝子としての作用を有することが示された。また、WT1由来の特定のペプチドでHLA-A\*0201陽性またはHLA-A\*2402陽性の末梢血単核球をin vitroで刺激することにより、ペプチド特異的な細胞傷害性T細胞 (CTL) が誘導され、これらのCTLは、内因性にWT1を発現する白血病や固体癌の癌細胞を傷害することが示された。これらの結果より、WT1は癌免疫療法 (癌ワクチン療法) の有望な標的分子であることが明らかとなった (非特許文献4を参照)。しかしながら、当該WT1がHLA-A26抗原に結合性の癌抗原ペプチド部分を有しているか否かは、未だ明らかにされていない。

またHLA-A2抗原の1種であるHLA-A\*0201抗原に結合性の癌抗原ペプチドに関しては、当該抗原への結合配列が推測されているものの (特許文献1を参照)、現在までに効果が確認されている癌抗原ペプチドはごく僅かである (特許文献2を参照)。

【0003】

【特許文献1】WO 00/18795号公報

【特許文献2】WO 00/06602号公報

【非特許文献1】Cell 60: 509, 1990

【非特許文献2】Nature 343: 774, 1990

【非特許文献3】Int. Rev. Cytol. 181: 151, 1998

【非特許文献4】Int. J. Hematol 76: 127, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、WT1由来の癌抗原ペプチド、および当該ペプチドのCTL誘導剤としての使用などを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、WT1由来の新規な癌抗原ペプチドの同定につき鋭意検討を行った。その結果、配列番号:2に記載のペプチドがHLA-A26拘束性のCTLを誘導することを明らかにした。すなわちWT1には、多数存在するHLA抗原サブクラスのうちHLA-A26抗原に結合してCTLにより認識される癌抗原ペプチド部分が存在していることを初めて見出した。そしてこの知見により、HLA-A26陽性の癌患者に対してWT1特異的CTLを誘導することのできる新たな癌ワクチン療法が可能となった。

また本発明者は、従来効果が知られていなかった配列番号:3に記載のペプチドが、HLA-A\*0201抗原に結合してCTLにより認識されるという癌抗原ペプチドとしての活性を有することを初めて見出した。

【0006】

以上に示された本発明のWT1由来の癌抗原ペプチドおよび当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド等は、CTLの誘導剤、すなわち癌ワクチンとして有効に用いることができる。また本発明の癌抗原ペプチドは、WT1特異的CTLの検出用試薬の成分としても有効に用いることができる。本発明はこのような知見に基づき完成するに至ったものである。

# 【0007】

すなわち本発明は、

- (1) 配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列に由来するHLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチド、
- (2) 配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列における連続する8～11アミノ酸を含有する、または該連続するアミノ酸からなる、前記(1)記載のペプチド、
- (3) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有する、前記(1)または(2)記載のペプチド、
- (4) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド、
- (5) 前記(1)～(4)いずれか記載のペプチドを含有するエピトープペプチド、
- (6) 前記(1)～(5)いずれか記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- (7) 前記(6)記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、
- (8) 前記(7)記載の発現ベクターを含有する細胞、
- (9) 前記(8)記載の細胞を、ペプチドの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、前記(1)～(5)いずれか記載のペプチドの製造方法、
- (10) 前記(1)～(4)いずれか記載のペプチドに特異的に結合する抗体、
- (11) 配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列に由来するHLA-A26結合性癌抗原ペプチド、好ましくは前記(2)～(4)いずれか記載のペプチドとHLA-A26抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、
- (12) 配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列に由来するHLA-A26結合性癌抗原ペプチド、好ましくは前記(2)～(4)いずれか記載のペプチドとHLA-A26抗原との複合体を認識するCTL、
- (13) 前記(1)～(5)いずれか記載のペプチド、前記(7)記載の発現ベクター、前記(8)記載の細胞、前記(11)記載の抗原提示細胞、または前記(12)記載のCTLと、薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物、
- (14) CTLの誘導剤として使用される、前記(13)記載の医薬組成物、
- (15) 癌ワクチンとして使用される、前記(13)記載の医薬組成物、
- (16) 配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列に由来するHLA-A26結合性癌抗原ペプチド、好ましくは前記(2)～(4)いずれか記載のペプチドとHLA-A26抗原とを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマー、
- (17) 前記(16)記載のHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーを成分として含有する、WT1由来のHLA-A26結合性癌抗原ペプチド特異的なCTLの検出用試薬、
- (18) 以下のa)～f)：
  - a) 配列番号：3または配列番号：4に記載のアミノ酸配列を含有するペプチド、
  - b) 上記a)のペプチドを含有するエピトープペプチド、
  - c) 上記a)またはb)のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、
  - d) 上記c)の発現ベクターを含有する細胞、
  - e) 上記a)のペプチドとHLA-A\*0201抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、および
  - f) 上記a)のペプチドとHLA-A\*0201抗原との複合体を認識するCTL、のなかから選ばれるいずれかと薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物、
- (19) CTLの誘導剤として使用される、前記(18)記載の医薬組成物、
- (20) 癌ワクチンとして使用される、前記(18)記載の医薬組成物、
- (21) 配列番号：3または配列番号：4に記載のアミノ酸配列を含有するペプチドとHLA-A\*0201抗原とを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマー、ならびに
- (22) 前記(21)記載のHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまた

はHLAペントマーを成分として含有する、WT1由来のHLA-A<sup>\*</sup>0201結合性癌抗原ペプチド特異的なCTLの検出用試薬、に関する。

### 【発明の効果】

#### 【0008】

本発明により、WT1由来の癌抗原ペプチド、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、これらペプチドやポリヌクレオチドを含むCTLの誘導剤などが提供される。本発明のCTLの誘導剤は癌ワクチンとして有用である。本発明の癌ワクチンは、HLA-A26陽性またはHLA-A<sup>\*</sup>0201陽性の多くの癌患者に適用可能である。

### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0009】

本発明は、配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列に由来するHLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチドを提供する。

ここで配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列は、Cell 60:509, 1990、NCBIデータベースAccession No. XP-034418およびAccession No. P19544に記載された公知の配列である。当該ヒトWT1のアミノ酸配列を配列番号：1に示す。HLA-A26抗原としては、HLA-A<sup>\*</sup>2601、HLA-A<sup>\*</sup>2602、HLA-A<sup>\*</sup>2603などが知られている。当該HLA-A26抗原は、日本人の約20%が保有しているHLA抗原である。

#### 【0010】

本発明は、WT1のアミノ酸配列中に、HLA-A26抗原に結合してCTLにより認識される癌抗原ペプチド部分が存在していることを初めて見出し、完成された。

本発明において「HLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有する」とは、HLA-A26抗原に結合して細胞傷害性T細胞(CTL)により認識される活性を有することを意味し、「HLA-A26抗原に結合してCTLを誘導する(CTL誘導活性を有する)」こと、および「HLA-A26抗原に結合してCTLを活性化する(CTL活性化活性を有する)」ことと同義語である。

#### 【0011】

従って、本発明の「配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列に由来するHLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチド」は配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列の一部からなり、HLA-A26抗原に結合して細胞傷害性T細胞(CTL)により認識され得る癌抗原ペプチドを含むペプチドを意味し、当該癌抗原ペプチド自体をも包含する。本発明における癌抗原ペプチドは配列番号：1に記載のヒトWT1のアミノ酸配列の一部からなり、HLA-A26(HLA-A26抗原)結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチドである限り、如何なるペプチドであっても良く、その長さとしては好ましくは8～11アミノ酸、より好ましくは9～10アミノ酸からなるペプチドが挙げられる。本発明の癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチドはこの癌抗原ペプチドのN末端またはC末端に数個～複数個のアミノ酸残基が付加していても良く、付加がある場合、本発明のペプチド全体の長さとしては通常連続する8～100アミノ酸、好ましくは連続する8～50アミノ酸、より好ましくは連続する8～30アミノ酸が挙げられる。

前記本発明の癌抗原ペプチドは、例えば配列番号：1に記載のアミノ酸配列における連続する8～11アミノ酸からなる部分ペプチド(候補ペプチド)を合成し、該ペプチドがHLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するか否かをアッセイすることにより、同定することができる。

#### 【0012】

ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該合成方法としては、文献(ペプタイド・シンセシス(Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ(The Proteins), Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善(株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株), 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991)などに記載されている方法が挙げられる。

#### 【0013】

候補ペプチドがHLA-A26結合性癌抗原ペプチドであることは、例えば Tissue Antigen 6

1: 136. 2003に記載の方法や、後述の実施例に記載の方法などにより調べることができる。候補ペプチドがHLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチドであることも同様にして調べることができる。

#### 【0014】

すなわちまず、HLA-A26抗原陽性のヒトから末梢血単核球（PBMC）を分離し、候補ペプチドを添加（パルス）して培養する。培養後、数日おきにペプチド添加による刺激を数回繰り返してペプチド特異的なCTLを増やす。次に当該CTLによるペプチド特異的なCTLの反応をCTLによるIFN- $\gamma$ などのサイトカイン産生や細胞傷害活性を測定することにより検出する。細胞傷害活性は、例えば<sup>51</sup>Crリリースアッセイ（Int. J. Cancer, 58:p317, 1994）などにより測定する。アッセイにおいて使用する標的細胞としては、<sup>51</sup>CrでラベルしたWT1陽性かつHLA-A26陽性の細胞が挙げられる。具体的には、例えばWT1陽性およびHLA-A26陰性である白血病細胞株にHLA-A26遺伝子（例えばGenbank Accession No. D14350）を導入した<sup>51</sup>Crラベル化細胞などが挙げられる。

以上のようなアッセイにより、CTLが標的細胞を傷害したり、サイトカインを産生した場合は、候補ペプチドが「HLA-A26結合性癌抗原ペプチドである」あるいは「HLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチドである」と判断する。

#### 【0015】

本発明のHLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチドの具体的な態様として、本発明は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するペプチドを提供する。当該ペプチドは、HLA-A26抗原に結合してCTLにより認識される活性を有する限り、その長さは特に限定されない。しかしながら、HLA抗原に結合性を有するペプチド（癌抗原ペプチド）は、一般的に8～11アミノ酸からなることが知られている。従って配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有する本発明のペプチドにおける癌抗原ペプチド部分は、9～11アミノ酸からなるペプチドであることが好ましく、9～10アミノ酸からなるペプチドであることがより好ましい。最も好ましくは配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチドである。

#### 【0016】

前記本発明のペプチドは、活性を保持する範囲内で、適宜改変されていても良い。ここでアミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は付加（ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む）を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の数および位置は、癌抗原ペプチドとしての活性を有する限り任意であるが、前記したように通常、HLA抗原に結合するペプチドの長さが8～11アミノ酸程度であることから、1個から数個の範囲が好ましい。

#### 【0017】

本発明はまた、前記本発明のペプチドとヘルパーペプチド若しくは他の癌抗原ペプチドとを含有するペプチド（いわゆる「エピトープペプチド」）を提供する。

#### 【0018】

近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したペプチド（エピトープペプチド）が、効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2, -A3, -A11, B53拘束性CTLエピトープを連結した約30merのペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。

#### 【0019】

またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたペプチド（エピトープペプチド）により、効率的にCTLが誘導されることも示されている。ここでヘルパーエピトープとはCD4陽性T細胞を活性化させる作用を有するペプチドを指すものであり（Immunity, 1:751, 1994）、例えばB型肝炎ウイルス由来のHBV c 1 2 8 - 1 4 0 や破傷風毒素由来のTT947-967などが知られている。当該ヘルパーエピトープにより活性化されたCD4陽性T細胞は、CTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフ

エクター活性化などの作用を発揮するため、抗腫瘍免疫応答に重要であると考えられている。このようなヘルバーエピトープとCTLエピトープとを連列したペプチドの具体例として、例えはJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルバーエピトープより構成されるペプチドをコードするDNA(ミニジーン)が、イン・ビボでそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。また実際に、CTLエピトープ(メラノーマ抗原gp100の第280位～288位からなる癌抗原ペプチド)とヘルバーエピトープ(破傷風毒素由来Tヘルバーエピトープ)とを連結したペプチドが臨床試験に供されている(Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024)。

### 【0020】

従って、前記本発明のペプチドを含む複数のエピトープを連結させたCTL誘導活性を有するエピトープペプチドも、本発明のペプチドの具体例として例示することができる。

ここで、本発明の癌抗原ペプチドに連結させるエピトープがCTLエピトープ(癌抗原ペプチド)の場合、用いるCTLエピトープとしては、WT1由来のHLA-A\*0201, -A\*0204, -A\*0205, -A\*0206, -A\*0207, -A11, -A24, -A31, -A\*6801, -B7, -B8, -B\*2705, -B37, -Cw\*0401, -Cw\*0602に結合性のCTLエピトープ等が挙げられる(Int. J. Hematol 76: 127, 2002、Int. J. Hematol 78: 56, 2003、WO 00/06602号公報、WO 00/18795号公報)。これらCTLエピトープは複数個連結することが可能であり、1つのCTLエピトープの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により(Immunogenetics, 41:178, 1995)、8～14アミノ酸程度を挙げることができる。

### 【0021】

また本発明の癌抗原ペプチドに連結させるエピトープがヘルバーエピトープの場合、用いるヘルバーエピトープとしては、前述のようなB型肝炎ウイルス由来のHBV c128-140や破傷風毒素由来のTT947-967、またはWT1由来のヘルバーエピトープであるLys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His(配列番号:5)などが挙げられる。また当該ヘルバーエピトープの長さとしては、13～30アミノ酸程度、好ましくは13～17アミノ酸程度を挙げることができる。

### 【0022】

本発明のエピトープペプチドとして、具体的には、例えは配列番号:2に記載のアミノ酸配列からなるペプチドとヘルバーエピトープとを含有するエピトープペプチドが挙げられる。

より具体的には、例えは配列番号:2に記載のアミノ酸配列よりなるペプチドと配列番号:5に記載のアミノ酸配列よりなるペプチドとを含有するエピトープペプチド、配列番号:2に記載のアミノ酸配列よりなるペプチドと破傷風毒素由来のヘルバーペプチド(例えはPhe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu;配列番号:6)とを含有するエピトープペプチド、または配列番号:2に記載のアミノ酸配列よりなるペプチドと Ala Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu(配列番号:7、Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024)とを含有するエピトープペプチドなどが挙げられる。

### 【0023】

このような複数のエピトープを連結させたペプチド(エピトープペプチド)は、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。またこれら複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。すなわち、当該ポリヌクレオチドを周知の発現ベクターに挿入し、得られた組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換して作製された形質転換体を培養し、培養物より目的の複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを回収することにより製造することができる。これらの手法は、前述のように文献記載の方法(Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory(1983)、DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS(1985))や後述の方法などに準じて行うことができる。

## 【0024】

以上のようにして製造された複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを前述の510リリースアッセイ等に供すること等により、CTL誘導活性を測定することができる。

## 【0025】

以上に示した本発明のペプチド（エピトープペプチドを含む）のN末端アミノ酸のアミノ基、またはC末端アミノ酸のカルボキシル基は、修飾されていても良い。すなわち、当該N末端のアミノ酸残基及び/又はC末端のアミノ酸残基が修飾されたペプチドも、本発明のペプチドの範疇に含まれる。

## 【0026】

ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1～3個の炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられ、アシル基の具体例としては炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

## 【0027】

C末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドとしては、例えばエステル体およびアミド体が挙げられ、エステル体の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル、炭素数5から7のシクロアルキルエステル等が挙げられ、アミド体の具体例としては、アミド、炭素数1から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド等が挙げられる。

## 【0028】

本発明はまた、前記本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもRNAの形態であっても良い。これら本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドのアミノ酸配列情報およびそれによりコードされるDNAの配列情報に基づき容易に製造することができる。具体的には、通常のDNA合成やPCRによる増幅などによって、製造することができる。

## 【0029】

具体的には、例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるペプチドとヘルバーエピトープとを含有するエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

好ましくは、例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列よりなるペプチドと配列番号：5に記載のアミノ酸配列よりなるペプチドとを含有するエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号：2に記載のアミノ酸配列よりなるペプチドと破傷風毒素由来のヘルバーペプチド（例えばPhe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu；配列番号：6）とを含有するエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチド、または配列番号：2に記載のアミノ酸配列よりなるペプチドとAla Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu（配列番号：7、Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024）とを含有するエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドなどを挙げることができる。

## 【0030】

前記で作製された本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込むことにより、本発明のペプチドを発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。

ここで用いる発現ベクターとしては、用いる宿主や目的等に応じて適宜選択することができ、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。

## 【0031】

例えは、宿主が大腸菌の場合、ベクターとしては、pUC118、pUC119、pBR322、pCR3等の

プラスミドベクター、 $\lambda$ ZAPII、 $\lambda$ gt11などのファージベクターが挙げられる。宿主が酵母の場合、ベクターとしては、pYES2、pYEUrA3などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、pAcSGHisNT-Aなどが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、pKCR、pCDM8、pGL2、pCDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMVなどのプラスミドベクターや、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。

### 【0032】

前記ベクターは、発現誘導可能なプロモーター、シグナル配列をコードする遺伝子、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していても良い。

また、単離精製が容易になるように、チオレドキシン、Hisタグ、あるいはGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）等との融合タンパク質として発現する配列が付加されても良い。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター（lac、lac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど）を有するGST融合タンパクベクター（pGEX4Tなど）や、Myc、Hisなどのタグ配列を有するベクター（pCDNA3.1/Myc-Hisなど）、さらにはチオレドキシンおよびHisタグとの融合タンパク質を発現するベクター（pET32a）などを用いることができる。

### 【0033】

前記で作製された発現ベクターで宿主を形質転換することにより、当該発現ベクターを含有する形質転換細胞を作製することができる。

ここで用いられる宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。大腸菌としては、E. coli K-12系統のHB101株、C600株、JM109株、DH5 $\alpha$ 株、AD494(DE3)株などが挙げられる。また酵母としては、サツカロミセス・セルビジエなどが挙げられる。動物細胞としては、L929細胞、BALB/c3T3細胞、C127細胞、CHO細胞、COS細胞、Vero細胞、HeLa細胞などが挙げられる。昆虫細胞としてはsf9などが挙げられる。

### 【0034】

宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド（Lipofectamine、Lipofectin; Gibco-BRL社）を用いる方法などが挙げられる。導入後、選択マーカーを含む通常の培地にて培養することにより、前記発現ベクターが宿主細胞中に導入された形質転換細胞を選択することができる。

### 【0035】

以上のようにして得られた形質転換細胞を好適な（ペプチドの発現可能な）条件下で培養し続けることにより、本発明のペプチドを製造することができる。得られたペプチドは、一般的な生化学的精製手段により、さらに単離・精製することができる。ここで精製手段としては、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。また本発明のポリペプチドを、前述のチオレドキシンやHisタグ、GST等との融合タンパク質として発現させた場合は、これら融合タンパク質やタグの性質を利用した精製法により単離・精製することができる。

### 【0036】

本発明は、本発明のペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、本発明のペプチドを免疫原とするポリクローナル抗体であっても、またモノクローナル抗体であっても良い。

本発明の抗体は前記のように本発明のペプチドに特異的に結合するものであれば特に制限されないが、具体的には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるペプチドに特異的に結合する抗体が挙げられる。

### 【0037】

これらの抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al

・ (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12～11.13、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D. ら編, Cold Spring Harber Laboratory Press 出版 New York 1989)。

#### 【0038】

具体的には、本発明のペプチドを免疫原として用い、家兎等の非ヒト動物を免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、本発明のペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髄腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4～11.11)。

#### 【0039】

本発明のペプチドに対する抗体の作製は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プロロニックポリオル、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニンおよびジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG (カルメットーゲラン桿菌) やコリネバクテリウム-バルヴムなどのヒトアジュバントなどがある。

#### 【0040】

以上のように本発明のペプチドを用いて常法により適宜動物を免疫することにより、ペプチドを認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。免疫学的診断は、イムノプロット法、放射免疫測定法 (RIA) 、酵素免疫測定法 (ELISA) 、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。このような免疫学的診断は、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えは白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の診断において有効である。

#### 【0041】

本発明は、本発明のペプチドとHLA-A26抗原との複合体の提示された抗原提示細胞を提供する。

後述の実施例において、本発明のペプチド刺激によりCTLの誘導が認められたが、これは、本発明のペプチドとHLA-A26抗原との複合体の提示された抗原提示細胞が存在し、この抗原提示細胞を特異的に認識するCTLが誘導されたことを示すものである。このような、HLA-A26抗原と本発明のペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞は、後述する細胞療法 (DC療法) において有効に用いられる。

#### 【0042】

本発明の抗原提示細胞は、本発明の癌抗原ペプチドとHLA-A26抗原との複合体の提示された抗原提示細胞であれば良く、具体的には、例えは配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるペプチドとHLA-A26抗原との複合体が樹状細胞の細胞表面に提示された抗原提示細胞を挙げることができる。

#### 【0043】

細胞療法 (DC療法) において用いられる抗原提示細胞は、癌患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、この細胞に本発明のペプチドを体外でバルスするか、または本発明のポリヌクレオチドやそれを含有する発現ベクターを細胞内に導入して、HLA-A26抗原と本発明の癌抗原ペプチドとの複合体を細胞表面に提示させることにより作製される。ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明のペプチドを提示可能なHLA-A26抗原を細胞表面に発現している細胞であれば特に限定されないが、抗原提示能が高いとされている樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞にバルスされるものとしては、本発明のペプチドであっても良いし、また本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドやそれを含有する発現ベクターであっても良い。

#### 【0044】

本発明の抗原提示細胞は、例えば癌患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明のペプチド（例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）を体外でパルスし、HLA-A26抗原と本発明のペプチドとの複合体を作製することにより得られる（Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998, J. Immunol., 158:p1796, 1997, Cancer Res., 59:p1184, 1999）。樹状細胞を用いる場合は、例えば、癌患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明のペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

#### 【0045】

また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチド）、あるいはそれを含有する発現ベクターを導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、当該ポリヌクレオチドがDNAの場合は Cancer Res., 56:p5672, 1996や J. Immunol., 161:p5607, 1998などを参考にして行うことができる。また、DNAのみならずRNAの形態でも同様に抗原提示細胞を調製することができ、この場合は、J. Exp. Med., 184:p465, 1996などを参考にすることができる。

#### 【0046】

本発明はまた、本発明の癌抗原ペプチドとHLA-A26抗原との複合体を認識するCTLを提供する。

後述の実施例において、本発明のペプチド刺激によりCTL誘導活性が認められた。これは、本発明のペプチドとHLA-A26抗原との複合体の提示された抗原提示細胞が存在し、この抗原提示細胞を特異的に認識するCTLが誘導されたことを示すものである。このような、HLA-A26抗原と本発明のペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLは、後述する養子免疫療法において有効に用いられる。

#### 【0047】

本発明のCTLは、本発明のペプチドとHLA-A26抗原との複合体を特異的に認識するものであれば良いが、具体的には、例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるペプチドとHLA-A26抗原との複合体を特異的に認識するCTLを挙げることができる。

#### 【0048】

養子免疫療法において用いられるCTLは、患者の末梢血リンパ球を単離し、これを本発明のペプチド（例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）、あるいは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチド）やそれを含有する発現ベクターでイン・ビトロで刺激する等により作製される（Journal of Experimental Medicine 1999, 190: 1669）。

#### 【0049】

以上に記載した本発明のペプチド、本発明の発現ベクター、本発明の細胞、本発明の抗原提示細胞、および本発明のCTLは、それぞれの物質に応じた適切な形態とすることにより、CTLの誘導剤、すなわち癌ワクチンの有効成分とすることができる。以下、具体的に説明する。

#### 【0050】

##### (1) 本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチン

本発明のペプチドは、CTLの誘導能を有するものであり、誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗癌作用を発揮することができる。従って本発明のペプチドは、癌の治療または予防のための癌ワクチンの有効成分とすることができる。すなわち本発明は、本発明のペプチドを有効成分として含有する癌ワクチン（癌ワクチンとしての医薬組成物）を提供する。本発明の癌ワクチンをHLA-A26陽性かつWT1陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA-A26抗原にペプチド（例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）が提示され、提示されたHLA-A26抗原複合体を特異的に認

識するCTLが増殖して癌細胞を破壊することができ、従って、癌の治療または予防が可能となる。本発明の癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防または治療のために使用することができる。

よって、本発明は別の態様として、本発明の癌ワクチンの有効量をHLA-A26陽性かつWT1陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

#### 【0051】

本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチンは、单一のCTLエピトープ（例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる癌抗原ペプチド）を有効成分とするものであっても、また他のペプチド（CTLエピトープやヘルバーエピトープ）と連結したエピトープペプチドを有効成分とするものであっても良い。すなわち近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドが、イン・ビボで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2, -A3, -A11, B53拘束性CTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結した約30merのエピトープペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。またCTLエピトープとヘルバーエピトープとを連結させたエピトープペプチドにより、効率的にCTLが誘導されることも示されている。このようなエピトープペプチドの形態で投与した場合、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、癌細胞を破壊する。このようにして癌の治療または予防が達成される。

#### 【0052】

また本発明のペプチドを有効成分とする癌ワクチンは、細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献（Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994）に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分、サイトカイン、植物由来成分、海洋生物由来成分、水酸化アルミニウムの如き鉱物ゲル、リソレシチン、ブルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液（エマルジョン製剤）などを挙げることができる。また、リポソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤なども考えられる。

#### 【0053】

投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。製剤中の本発明のペプチドの投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

#### 【0054】

(2) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分とするDNAワクチン

前記本発明のペプチドのみならず、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターもまた、癌の治療または予防のためのDNAワクチンの有効成分とすることができる。すなわち本発明は、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分として含有する癌ワクチン（癌ワクチンとしての医薬組成物）を提供する。また、本発明は別の態様として、本発明のDNAワクチンの有効量をHLA-A26陽性かつWT1陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

#### 【0055】

近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドをコード

するポリヌクレオチド、あるいはCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが、*in vivo*で効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープを連結したエピトープペプチドをコードするDNA(ミニジーン)が、イン・ビオでそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。

#### 【0056】

従って、本発明のエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに組み込むことにより、癌ワクチンの有効成分とすることができる。

#### 【0057】

本発明のポリヌクレオチド含有発現ベクターを癌ワクチン(DNAワクチン)の有効成分として適用する際には、以下の方法が使用され得る。

すなわち、本発明のポリヌクレオチドを細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等)のいずれの方法も適用することができる。

#### 【0058】

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法(DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

#### 【0059】

本発明のポリヌクレオチドを実際に医薬として作用させるには、当該ポリヌクレオチドを直接体内に導入する*in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採取し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す*ex vivo*法がある(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等)。*in vivo*法がより好ましい。

#### 【0060】

*in vivo*法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo*法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のポリヌクレオチド含有発現ベクターを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明のポリヌクレオチド含有発現ベクターを含有するリポソームまたは膜融合リポソーム(センダイウイルス(HVJ)-リポソーム等)においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができます。

製剤中の本発明のポリヌクレオチド含有発現ベクターの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明のポリヌクレオチド含有発現ベクターを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

#### 【0061】

以上のような本発明のポリヌクレオチド含有発現ベクターの癌患者への投与により、抗原提示細胞内で当該ポリヌクレオチドに対応するポリペプチドが高発現する。その後、細胞内分解を受けて生じた個々の癌抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体を特異的に認識するCTLが体

内で効率的に増殖し、癌細胞を破壊する。以上のようにして、癌の治療または予防が達成される。本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを有効成分とする癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固体癌の予防または治療のために使用することができる。

#### 【0062】

##### (3) 本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチン

本発明は、本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンを提供する。

近年、癌患者の末梢血からリンパ球を分離し、その中から樹状細胞を誘導し、イン・ビトロでペプチド等をパルスして調製した抗原提示細胞を皮下投与などにより患者に戻す細胞療法(DC療法)が報告されている(Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998, J. Immunol., 158:p1796, 1997, Cancer Res., 59:p1184, 1999, Cancer Res., 56:p5672, 1996, J. Immunol., 161:p5607, 1998, J. Exp. Med., 184:p465, 1996)。従って前記本発明の抗原提示細胞を、細胞療法における癌ワクチンの有効成分として使用することができる。

#### 【0063】

本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンは、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。また投与量は、前記文献記載の投与量が例示される。

前記癌ワクチンを患者の体内に戻すことにより、HLA-A26陽性かつWT1陽性の患者の体内で効率良く特異的なCTLが誘導され、癌を治療または予防することができる。本発明の抗原提示細胞を有効成分とする癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固体癌の予防または治療のために使用することができる。

#### 【0064】

##### (4) 本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチン

本発明は、本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチン(癌ワクチンとしての医薬組成物)を提供する。本発明のCTLは、以下の養子免疫療法において有効に用いられる。

#### 【0065】

メラノーマにおいて、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養し、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている(J. Natl. Cancer. Inst., 86: 1159, 1994)。またマウスのメラノーマでは、脾細胞をイン・ビトロで癌抗原ペプチドTRP-2で刺激し、癌抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている(J. Exp. Med., 185:453, 1997)。これは、抗原提示細胞のHLA抗原と癌抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明のペプチドあるいは本発明のポリヌクレオチドや発現ベクターを用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して癌特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。従って前記本発明のCTLを、養子免疫療法における癌ワクチンの有効成分として使用することができる。

#### 【0066】

本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチンは、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。また投与量としては、前記文献記載の投与量が例示される。

前記癌ワクチンを患者の体内に戻すことにより、HLA-A26陽性かつWT1陽性の患者の体内でCTLによる癌細胞の傷害作用が促進され、癌細胞を破壊することにより、癌を治療することができる。本発明のCTLを有効成分とする癌ワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上

昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防または治療のために使用することができる。

#### 【0067】

本発明はまた、本発明の癌抗原ペプチドとHLA-A26抗原とを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーを提供する。

癌免疫療法において、治療前に癌抗原（癌抗原ペプチド）に対するCTL前駆細胞の頻度や量を予め調べることや、癌抗原（癌抗原ペプチド）による治療実施中の患者におけるCTLの頻度や量を調べることは、当該癌抗原（癌抗原ペプチド）に対する応答性が高い患者の選択や、治療効果のモニタリング、治療の適合性の判定などにおいて重要な指標となる。癌抗原ペプチドとHLA抗原とを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーおよびHLAペントマーは、抗原（抗原ペプチド）特異的CTLの検出、すなわち当該CTLの頻度や量を測定するための試薬として有用である。

#### 【0068】

ここでHLAテトラマーとは、HLA抗原の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2ミクログロブリンをペプチド（抗原ペプチド）と会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、アビジンに結合させることにより4量体化したもの指す（Science 279: 2103-2106 (1998)、Science 274: 94-96 (1996)）。

HLAモノマーとは前記HLAテトラマーの製造において用いられる、HLA抗原 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 2ミクログロブリン、抗原ペプチドの会合体をビオチン化したもの（単量体）を指す。

#### 【0069】

HLAダイマーとはHLA抗原 $\alpha$ 鎖とIg（イムノグロブリン、例えばIgG1）とを融合させ、これに $\beta$ 2ミクログロブリン、抗原ペプチドを結合させたものを指す（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6671-6675 (1993)）。HLAダイマーに結合した抗原ペプチド特異的CTLは、例えば標識抗IgG1抗体をIgG1に結合させることなどにより、検出することができる。

HLAペントマーとは近年開発された技術であり、HLA抗原と抗原ペプチドとの複合体5分子がCoiled-Coilドメインを介して重合した5量体を指す。HLA抗原-抗原ペプチドの複合体を蛍光色素等で標識することができるため、HLAテトラマー法と同様にフローサイトメーター等で解析することができる（<http://www.proimmune.co.uk/>参照）。

以上に述べたHLAモノマー、ダイマー、テトラマーおよびペントマーはいずれも受託合成可能であり、例えばProImmune社やBD Biosciences社などに委託することにより合成することができる。また現在では種々の抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーなども市販されている（（株）医学生物学研究所等）。

#### 【0070】

本発明のHLAモノマー、ダイマー、テトラマーおよびペントマーとして具体的には、例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるペプチドとHLA-A26抗原とを含有するHLAモノマー、ダイマー、テトラマーおよびペントマーが挙げられる。このうちCTLの検出においてはHLAテトラマーまたはHLAペントマーを用いることが好ましく、HLAテトラマーを用いることがより好ましい。

#### 【0071】

HLAモノマー、HLAテトラマーおよびHLAペントマーは、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡等の公知の検出手段により結合したCTLを容易に選別または検出することができるよう蛍光標識されていることが好ましい。具体的には、例えばフィコエリスリン（PE）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ペリジニンクロロフィルプロテイン（PerCP）、アロフィコシアニン（APC）などにより標識されたHLAモノマー、HLAテトラマーおよびHLAペントマーが挙げられる。

#### 【0072】

本発明のHLAモノマー、ダイマー、テトラマーおよびペントマーの成分であるHLA-A26抗原（HLA-A26抗原の $\alpha$ 鎖）は、Genbank Accession No. D14350に開示されているHLA-A26等の公知の塩基配列の情報に基づき、PCR法等の常法により容易にクローニングすることができる。

できる。

### 【0073】

本発明のHLAモノマー、ダイマー、テトラマーおよびペントマーの成分である $\beta$ 2ミクログロブリンは、ヒト由来の $\beta$ 2ミクログロブリンが好ましい。当該ヒト $\beta$ 2ミクログロブリンはGenBank Acc. No. AB021288に開示されているヒト $\beta$ 2ミクログロブリンの公知の塩基配列情報に基づき、PCR法等の常法により容易にクローニングすることができる。

### 【0074】

HLAモノマー、ダイマー、テトラマーおよびペントマー作製法については、前記各文献により周知であるが、具体的にHLAテトラマーの作製法につき簡単に述べると以下のようになる。

まずタンパク質を発現可能な大腸菌や哺乳動物細胞に、HLA-A26 $\alpha$ 鎖発現ベクターおよび $\beta$ 2ミクログロブリン発現ベクターを導入し発現させる。ここでは大腸菌（例えはBL21）を用いることが好ましい。得られた単量体HLA-A26複合体と本発明ペプチドとを混合し、可溶性のHLA-ペプチド複合体を形成させる。次にHLA-ペプチド複合体におけるHLA-A26 $\alpha$ 鎖のC末端部位の配列をBirA酵素によりビオチン化する。このビオチン化されたHLA-ペプチド複合体と蛍光標識されたアビジンとを4:1のモル比で混合することにより、HLAテトラマーを調製することができる。なお、前記各ステップにおいて、ゲルろ過等によるタンパク精製を行うことが好ましい。

### 【0075】

前記で本発明のHLAモノマー、ダイマー、テトラマーおよびペントマーは、HLA-A26結合性癌抗原ペプチド特異的なCTLの検出用試薬として有効に用いられる。

本発明のCTL検出用試薬は、例えは以下の目的に使用することができる：

- 1) 本発明の癌抗原ペプチドによる治療開始前に、本発明の癌抗原ペプチドに対するCTL前駆細胞の頻度や量を調べる。これにより、当該癌抗原ペプチドに対する患者の応答性を判断することができる。
- 2) 本発明の癌抗原ペプチドによる治療実施中の患者におけるCTLの頻度や量を調べる。これにより治療効果のモニタリング、治療の適合性の判定、治療が順調に進んでいることの確認などを行うことができる。

### 【0076】

CTLの検出法としては、具体的には、被験患者よりCTLを含む生体試料（例えはPBMC）を単離し、本発明のHLAテトラマー等と前記生体試料とを接触させ、HLAテトラマー等に結合した本発明ペプチド特異的なCTLの存在頻度または量を、フローサイトメーター等で測定する。

### 【0077】

本発明においてはまた、Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val（配列番号：3）のアミノ酸配列を含有するペプチドが、HLA-A\*0201結合性癌抗原ペプチドであることを初めて見出した。当該配列番号：3に記載のペプチド配列は、W0 00/18795号公報において開示されている。しかしながら、HLA-A\*0201結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有すること、そして細胞内プロセッシングによりWTタンパクから生じ、当該ペプチドとHLA-A\*0201抗原との複合体が細胞表面に提示されCTLにより認識されること、そしてこのペプチドは治療上有効な癌抗原ペプチドであることは、本発明において初めて見出された知見である。

### 【0078】

従って本発明は、以下のa)～f)：

- a) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列を含有するペプチド、
- b) 上記a)のペプチドを含有するエピトープペプチド、
- c) 上記a)またはb)のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、
- d) 上記c)の発現ベクターを含有する細胞、
- e) 上記a)のペプチドとHLA-A\*0201抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、および

f) 上記a)のペプチドとHLA-A\*0201抗原との複合体を認識するCTL、のなかから選ばれるいずれかと薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物を提供する。

#### 【0079】

なおHLA-A\*0201抗原の如きHLA-A2抗原においては、該HLA抗原に結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している。すなわち、HLA-A2結合性ペプチドのモチーフとして、8～11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、C末端のアミノ酸残基がバリンまたはロイシンであることが知られている（Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155:p4749, 1995）。よって前記配列番号：3のペプチドの第2位及び/またはC末端のアミノ酸残基を、前記モチーフ上とり得るアミノ酸残基に置換することが可能である。従って、前記配列番号：3のペプチドのみならず、前記モチーフ上の改変体である配列番号：4のペプチド（ただし配列番号：3のペプチドは除く）も、癌抗原ペプチド活性を有する限り、同様の医薬組成物として用いることができる。

#### 【0080】

すなわち本発明は、以下のa) '～f) '：

- a) '配列番号：4に記載のアミノ酸配列を含有する癌抗原ペプチド、
- b) '上記a) 'のペプチドを含有するエピトープペプチド、
- c) '上記a) 'またはb) 'のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、
- d) '上記c) 'の発現ベクターを含有する細胞、
- e) '上記a) 'のペプチドとHLA-A\*0201抗原との複合体が提示されている抗原提示細胞、および
- f) '上記a) 'のペプチドとHLA-A\*0201抗原との複合体を認識するCTL、のなかから選ばれるいずれかと薬学的に許容される担体とを含有する医薬組成物を提供する。

#### 【0081】

これらa)～f) およびa) '～f) 'に記載の各物質の作製法、活性測定法、およびこれらの物質のCTL誘導剤や癌ワクチンとしての用途については、全て本発明のHLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチドのそれにおいて記載したとおりである。ただし配列番号：2に記載のペプチドに替えて配列番号：3または4に記載のペプチドを用い、またHLA-A26抗原に替えてHLA-A\*0201抗原を用いる。ここでHLA-A\*0201抗原はGenbank Accession No. M84379により公知である。

#### 【0082】

また本発明は、Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val（配列番号：3）に記載のアミノ酸配列を含有するペプチドとHLA-A\*0201抗原とを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマー、および、これらを成分として含有するWT1由来のHLA-A\*0201結合性癌抗原ペプチド特異的なCTLの検出用試薬を提供する。これらHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマー、HLAペントマー、およびこれらを成分として含有するCTLの検出用試薬についても、前記HLA-A26結合性癌抗原ペプチドとしての活性を有するペプチドのそれにおいて記載したとおりである。ただし配列番号：2に記載のペプチドに替えて配列番号：3または4に記載のペプチドを用い、またHLA-A26抗原に替えてHLA-A\*0201抗原を用いる。

#### 【0083】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0084】

#### HLA-A\*0201に結合する抗原ペプチドの同定

ヒトWT1のアミノ酸配列（Cell 60:509, 1990、配列番号：1）の第7位から15位に相当

する配列のペプチド（配列番号：3）を固相合成法により合成した。

インフォームドコンセントを得たHLA-A\*0201陽性の健常人より採血し、Ficoll-Hyque分離液を用いて末梢血単核球（PBMC）を分離した。TAP遺伝子欠損のため内因性のペプチドをHLAに提示できないHLA-A\*0201陽性のT2細胞株（J. Immunol. 150: 1763, 1993）に、配列番号3のペプチドを20 $\mu$ Mの濃度で2時間パルスした後、放射線照射（7500cGy）し、PBMCと細胞数1:1の割合で混合培養を行った。培養液にはcomplete medium (45% AIM-V培地、45% RPMI1640培地、10% 非動化ヒトAB血清、0.1mM MEM非必須アミノ酸、100ng/mL streptomycin、100IU/mL penicillin、25ng/mL 2-mercaptoethanolより成る)を用いた。7日後、2回目の刺激を同様に行い、その翌日に25IU/mLのIL-2（塩野義製薬）を添加した。合計5回の刺激を行い、最後の刺激より5日目に得られたエフェクター細胞を、細胞傷害活性の測定に使用した。

#### 【0085】

標的細胞に対するCTLの細胞傷害活性はクロミウム遊離試験（ $^{51}\text{Cr}$ -release assay）にて測定した。すなわち、 $^{51}\text{Cr}$ で標識した標的細胞（全量100 $\mu$ L中に $1\times 10^4$ 個）を丸底96穴プレート内で様々な数のエフェクター細胞（100 $\mu$ L）と混合培養した。37°Cにて3~5時間培養後、プレートを遠心し、上清100 $\mu$ Lを回収し $\gamma$ 線を計測した。特異的細胞傷害活性（% specific lysis）は以下の通り計算した：

$$\% \text{ specific lysis} = (\text{cpm experimental release} - \text{cpm spontaneous release}) / (\text{cpm maximal release} - \text{cpm spontaneous release}) \times 100.$$

#### 【0086】

標的細胞の上清から自然遊離（spontaneous release）を、1%トリトンX-100溶液で処理した標的細胞の上清から最大遊離（maximal release）を、それぞれ測定した。有意差検定は、Student's t-testを用いて行った。刺激に用いたペプチドをパルスしたT2細胞、及びペプチドをパルスしていないT2細胞を標的細胞として細胞傷害活性を測定した結果を図1に示す。配列番号：3のペプチドをパルスしたT2細胞の刺激で誘導されたCTLは、ペプチドをパルスしていないT2細胞に比して、ペプチドをパルスしたT2細胞に対して、より強い細胞傷害活性を示した（p < 0.05）。この結果より、配列番号：3のペプチドの刺激により、WT1タンパク質由来の配列番号：3のペプチドを特異的に認識するCTLが、HLA-A\*0201陽性のヒトPBMCから誘導されることが明らかとなった。

#### 【0087】

次に、配列番号：3のペプチドで誘導されたCTLの、HLA-A\*0201陽性でWT1を発現しているTF-1細胞株（J. Cell. Physiol. 140: 323, 1989）、またはHLA-A\*0201陽性であるがWT1を発現していないJY細胞株（J. Biol. Chem. 252, 1997）に対する細胞傷害性を検討した。結果を図2に示す。配列番号：3のペプチドの刺激で誘導されたCTLはTF-1細胞を傷害したが、JY細胞を傷害しなかった（p < 0.05）。この結果より、配列番号：3のペプチドは細胞内で内因性に発現するWT1タンパク質からプロセシングにより生じ、HLA-A\*0201分子とともに抗原提示され、CTLに認識されることが明らかとなった。

#### 【実施例2】

#### 【0088】

##### HLA-A26に結合する抗原ペプチドの同定

ヒトWT1のアミノ酸配列（Cell 60:509, 1990、配列番号：1）の第368位から376位に相当する配列のペプチド（配列番号：2）を固相合成法により合成した。

インフォームドコンセントを得たHLA-A26陽性の健常人より実施例1と同様の方法でPBMCを調製し、配列番号：2のペプチドを添加して刺激を行った。1週間後、PBMCに配列番号：2のペプチドをパルスし、これを刺激細胞として刺激を加えた。この刺激を1週間おきに合計4回行った。さらに1週間後にEBウイルスでトランスフォームしたB細胞（B-LCL）に配列番号：2のペプチドをパルスし、これを刺激細胞として刺激を行った。最後の刺激の5日後に配列番号：2のペプチドをパルスしたB-LCLとペプチドをパルスしていないB-LCLを標的細胞として、実施例1と同様な方法でクロミウム遊離試験により細胞傷害活性を測定した。結果を図3に示す。配列番号：2のペプチドの刺激で誘導されたCTLは、ペプチドをパ

ルスしていないB-LCLに比して、ペプチドをパルスしたB-LCLに対して、より強い細胞傷害活性を示した。この結果より、配列番号：2のペプチドの刺激により、WT1タンパク質由來の配列番号：2のペプチドを特異的に認識するCTLが、HLA-A26陽性のヒトPBMCから誘導されることが明らかとなった。

#### 【産業上の利用可能性】

##### 【0089】

本発明により、WT1由來の癌抗原ペプチド、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、これらペプチドやポリヌクレオチドを含むCTLの誘導剤などが提供される。本発明のCTLの誘導剤は癌ワクチンとして有用である。本発明の癌ワクチンは、HLA-A26またはHLA-A\*0201陽性の多くの癌患者に適用可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0090】

【図1】配列番号：3のペプチド刺激で誘導されたCTLの、ペプチドパルスT2標的細胞（図中黒丸）、またはペプチド非パルスT2標的細胞（図中白丸）に対する細胞傷害活性を調べた結果を示すグラフである。図中、縦軸は特異的細胞傷害活性（% specific lysis）を、また横軸はエフェクター細胞数（E）と標的細胞数（T）との比（E/T比）を示す。

【図2】配列番号：3に記載のペプチド刺激で誘導されたCTLの、HLA-A\*0201陽性かつWT1発現TF-1細胞株（図中黒丸）、またはHLA-A\*0201陽性かつWT1非発現JY細胞株（図中白丸）に対する細胞傷害活性を調べた結果を示すグラフである。図中、縦軸は特異的細胞傷害活性（% specific lysis）を、また横軸はE/T比を示す。

【図3】配列番号：2のペプチド刺激で誘導されたCTLの、ペプチドパルスB-LCL標的細胞（図中黒棒）、またはペプチド非パルスB-LCL標的細胞（図中白棒）に対する細胞傷害活性を調べた結果を示すグラフである。図中、縦軸は特異的細胞傷害活性（% specific lysis）を、また横軸はE/T比を示す。

#### 【配列表フリーテキスト】

##### 【0091】

配列番号：2に記載のアミノ酸配列は合成ペプチドである。

配列番号：3に記載のアミノ酸配列は合成ペプチドである。

配列番号：4に記載のアミノ酸配列において、第2位のアミノ酸はロイシン、メチオニン、バリン、イソロイシンまたはグルタミンであり、第9位のアミノ酸はバリンまたはロイシンである。

配列番号：5に記載のアミノ酸配列は合成ペプチドである。

配列番号：6に記載のアミノ酸配列は合成ペプチドである。

配列番号：7に記載のアミノ酸配列は合成ペプチドである。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Sugiyama, Haruo

<120> Cancer antigen peptides derived from WT1

<130> 194247

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro  
1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala  
20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr  
35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro  
50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly  
65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe  
85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe  
100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe  
115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile  
130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr  
145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe  
165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser  
195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp  
210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln  
225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser  
245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu  
260 265 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile  
275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro  
290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys  
305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys  
325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro  
340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp  
355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln  
370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr  
385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys  
405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val  
420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala  
435 440 445

Leu

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 2

Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg  
1 5

<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 3

Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val  
1 5

<210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic peptide

<220>  
<221> misc-feature  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa is Leu, Met, Val, Ile or Gln.

<220>  
<221> misc-feature  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa is Val or Leu.

<400> 4

Asp Xaa Asn Ala Leu Leu Pro Ala Xaa  
1 5

<210> 5  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 5

Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His

1

5

10

15

<210> 6  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 6

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser  
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu  
20

<210> 7  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial

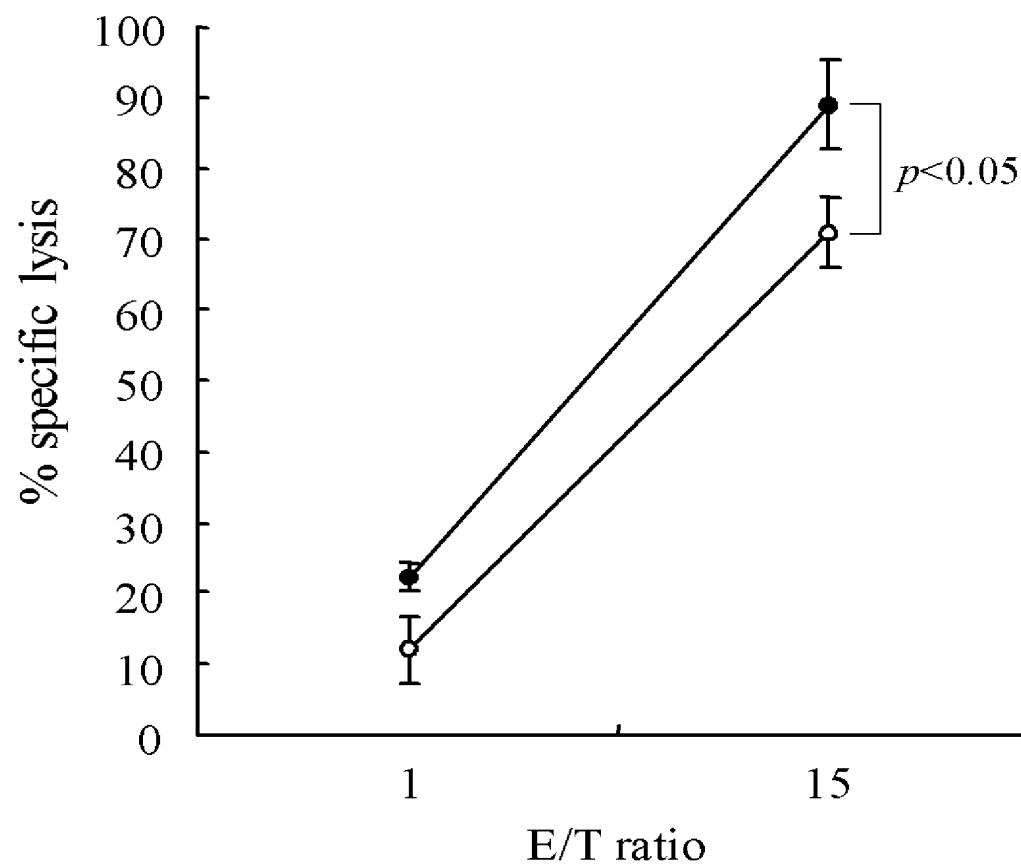
<220>  
<223> Synthetic peptide

<400> 7

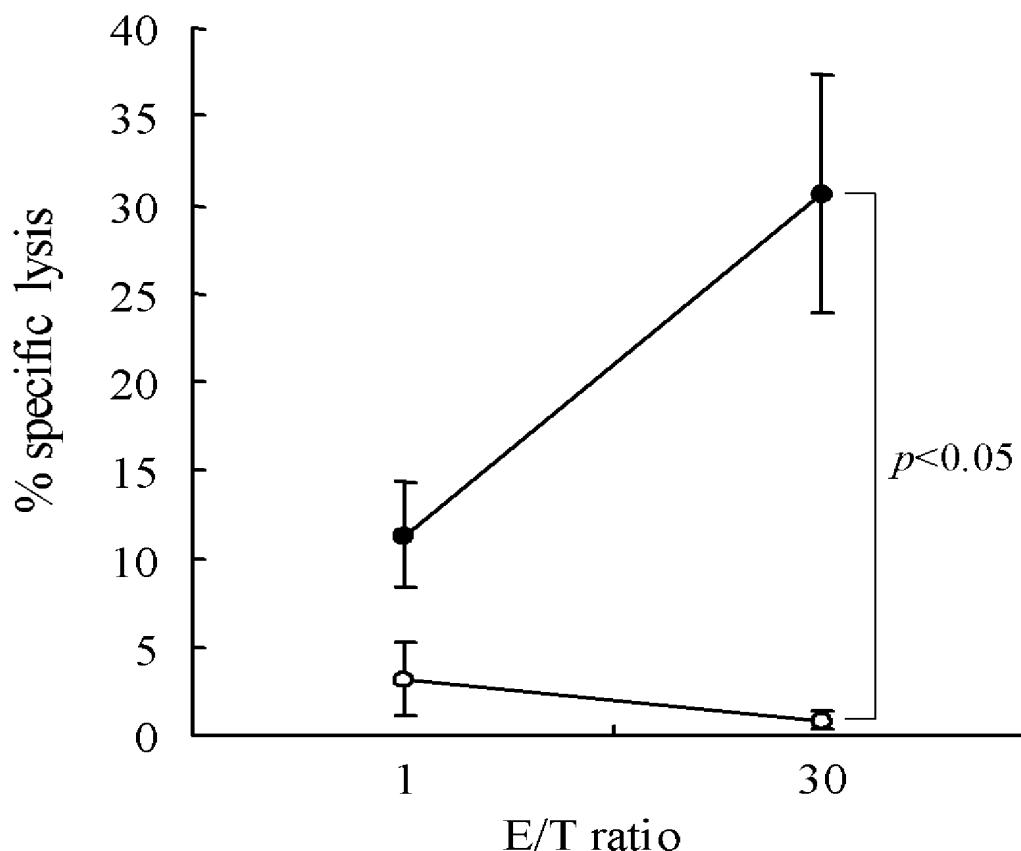
Ala Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
1 5 10 15

【書類名】図面

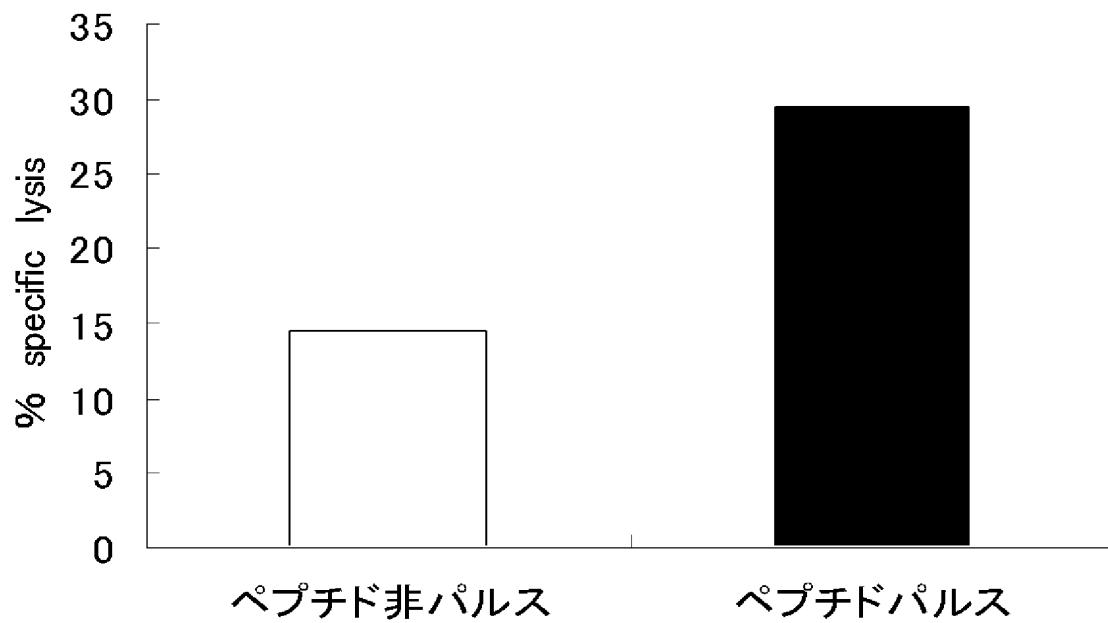
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 新たな癌ワクチンを提供する。

【解決手段】 W T 1 由来の H L A - A 2 6 結合性癌抗原ペプチド、当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、これらペプチドやポリヌクレオチドを含む C T L の誘導剤、および当該ペプチドやポリヌクレオチドを含む癌ワクチンに関する。

【選択図】 なし

出願人履歴

5 9 5 0 9 0 3 9 2

19950601

新規登録

大阪府箕面市船場西 2-19-30

杉山 治夫